



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 44 32 262 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 44 32 262.3
㉑ Anmeldetag: 10. 9. 94
㉒ Offenlegungstag: 20. 7. 95

㉓ Int. Cl.⁶:
A 61 K 45/08
A 61 K 35/74
A 61 K 33/08
A 61 K 31/29
A 61 K 31/70
A 61 K 31/415
A 61 K 31/34
A 61 K 31/425
A 61 K 31/44

DE 44 32 262 A 1

③① Innere Priorität: ③② ③③ ③①
13.01.94 DE 44 00 736.1 02.02.94 DE 44 03 106.8

⑦① Anmelder:
Denecke, Rainer, Dr.med.vet., 20149 Hamburg, DE

⑦④ Vertreter:
Klickow, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Hansmann, D.,
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 22767 Hamburg

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Präparatkombination zur Therapie und Prophylaxe von Erkrankungen des Verdauungstraktes

⑤⑦ Das Präparat dient zur Therapie und Prophylaxe von Erkrankungen des Verdauungstraktes, die bei Anwesenheit von pathogenen und/oder fakultativ-pathogenen Bakterien auftreten. Insbesondere ist an eine Anwendung bei Erkrankungen gedacht, die bei einem Auftreten der Genus *Helicobacter* und *Campylobacter* zu beobachten sind. Als Wirkstoff ist mindestens ein Anteil zur Säurehemmung und/oder Neutralisation und/oder ein Bestandteil zur Unterstützung einer Schutzschichtbildung im Schleimhautbereich mit mindestens einem Lantibioticum kombiniert. Es ist ebenfalls denkbar, sowohl einen Bestandteil zur Säurehemmung und/oder Neutralisation als auch einen Bestandteil zur Unterstützung einer Schutzschichtbildung miteinander und mit einem Lantibioticum zu kombinieren. Das Lantibioticum wird probiotisch im Verdauungstrakt durch gezielt zugegebene Bakterien erzeugt.

DE 44 32 262 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 05. 95 508 029/378

15/37

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Präparatkombinationen zur Therapie und Prophylaxe von Erkrankungen des Verdauungstraktes, die bei Anwesenheit von pathogenen und/oder fakultativ-pathogenen Bakterien auftreten, insbesondere bei einem Auftreten der Genus *Helicobacter* und *Campylobacter*.

Die bislang bekannten Präparate erzielen zwar kurzfristig eine gute Wirkung, es wird jedoch oft festgestellt, daß nach einigen Monaten die gleichen Krankheitssymptome wieder auftreten, da durch die Therapie keine restlose Ausheilung erfolgt ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine Präparatkombination der einleitend genannten Art derart anzugeben, daß die Wirksamkeit verbessert wird.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß als Wirkstoff mindestens ein Anteil zur Säurehemmung und/oder Neutralisation mit mindestens einem Bakterium zur probiotischen Erzeugung eines Lantibiotikums im Verdauungstrakt kombiniert ist.

Die krankmachende Wirkung von *Helicobacter pylori* beim Menschen ist hinlänglich bekannt.

Es gibt aber auch eine Vielzahl von Bakterien, die ursprünglich vom Tier auf den Menschen übertragen worden sind (Zoonosen), wie z. B. gastrische Spirillen und *Campylobacter-like-organisms* (CLO), die vergleichbare oder ähnliche Krankheiten/Läsionen wie *Helicobacter pylori* auslösen können. Auch *Proteus vulgaris* wäre zu nennen, der wie *Helicobacter pylori* Urease-positiv ist. Mischinfektionen sind sehr häufig.

Diese von *Helicobacter pylori* verschiedenen Keime werden auch von Mensch zu Mensch weiter übertragen. Die Durchseuchung mit Nicht-*Helicobacter pylori* Bakterien ist nicht zu unterschätzen. Die meisten dieser Bakterien leben auch wie *Helicobacter pylori* in der gleichen ökologischen Nische, d. h. auf und in der Magenschleimhaut unter der schützenden Schleimschicht. Besonders gefährdet sind Hunde- und Katzenhalter, sich mit diesen Keimen zu infizieren, (z. B. mit *H. canis*).

Krankheitsbilder, an denen oben genannte Bakterien beteiligt sind, werden in den folgenden Publikationen diskutiert: "Chronic Alcoholic Gastritis", Rajiv Uppal, MD; Syed K. Lateef, MD; Mark A. Korsten, MD; Fiorenzo Paronetto, MD; Charles S. Lieber, MD, Archives of Internal Medicine, April 1991, Vol. 151, Seite 760—764; "Detection and identification of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction", C Clayton, K Kleanthous, S Tabaqchali, J Clin Pathol 1991, 44, Seite 515—516. Ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen *Helicobacter pylori* und Magenkrebs findet sich im Aufsatz "Helicobacter pylori and gastric carcinoma", R.J.L.F. Loffeld, I. Willems, J.A. Flendrig & Arends, J.W. Histopathology 1990, 17, Seite 537—541.

Bislang bekannte Präparate zur Therapie der in den oben zitierten Publikationen genannten Erkrankungen weisen ein ungünstiges Verhältnis von Wirksamkeit und Nebenwirkungen auf. Aufgrund der gravierenden Folgen einer Infektion mit diesem Krankheitserregern s. o., ist eine wirksame und unbedenkliche Prophylaxe und Therapie erforderlich.

Die oben genannten Erkrankungen werden nach bislang angewandten Therapieverfahren mit Präparaten behandelt, deren wirksames Prinzip z. B. Wismutsalze sind. Da eine alleinige Therapie mit diesen Salzen sich als nicht ausreichend erwies, mußte ergänzend eine komplizierte antibiotische Kombinationstherapie durchgeführt werden (z. B. mit Amoxicillin und Metronidazol). Das Nebenwirkungsspektrum der bisher verwendeten Antibiotika ist hinreichend bekannt.

Derartige Behandlungsverfahren werden beispielsweise im Aufsatz "Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*", Timo U. Kosunen, Kari Seppala, Seppo Sarna, Pentti Sipponen, The Lancet, Vol 339, 11. April 1992, Seite 893 sowie in dem Übersichtsartikel von J. Ormand und N. Talley: "Helicobacter pylori: Controversies and an Approach to Management" aus Mayo Clin. Proc. 65: 414—426, 1990, beschrieben.

Darüber hinaus kann die rein symptomatische Therapie mit Antacida, H₂-Blockern und ATPase-Hemmern zu einer Überwucherung des Magens mit Bakterien und/oder Pilzen (Fäkalflora) führen, da der Säureschutz des Hohlorgans verlorengegangen ist. Einhergehend mit der Säurehemmung kommt es zu einem massiven Sekretionsrückgang von Lysozym aus den Magendrüsen. Dieses körpereigene, antibakteriell wirkende Enzym ist essentiell für die Repression von pathogenen Keimen. Insofern begünstigt die Säuresuppression gewisse ätiopathogenetischen Faktoren für diverse gastro-intestinalen Läsionen (z. B. Magenkarzinom und Karzinoide).

Die antibakterielle Wirksamkeit von Lantibiotika, insbesondere von Nisin, ist bereits bekannt. Eine Verwendung als Lebensmittelzusatz wird beispielsweise in der EP-A-0 453 972 beschrieben. Die antibakterielle Wirksamkeit von Nisin ist darüber hinaus auch in der US-PS 5 043 176 angegeben. Die Verwendung von Nisin im kosmetischen Bereich ist in der DE-OS 39 38 140 beschrieben.

Die eingangs genannten Bakterien, insbesondere *Helicobacter* sp., sind der ätiopathogenetische Faktor für die chronische Gastritis. Diese führt im Laufe der Zeit zur Schleimhautatrophie und intestinalen Metaplasie. Endstadium dieser Prozesse ist in der Regel ein Magentumor.

Durch rechtzeitigen prophylaktischen Einsatz von Lantibiotika, beispielsweise Nisin, ließe sich die Inzidenz dieser Tumoren drastisch senken. Die Besiedlung des Magens mit pathogenen Bakterien (z. B. *Gastrospillum hominis* oder *Helicobacter pylori*) kann zu einer Schwächung der Schleimhautresistenz führen, so daß Patienten, die auf die regelmäßige Einnahme von Corticosteroiden und nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDS) angewiesen sind, vermehrt peptische Geschwüre entwickeln.

Auch bei diesem Patientengut kann durch den rechtzeitigen prophylaktischen Einsatz von z. B. Nisin eine erhebliche Reduzierung dieser Krankheit erreicht werden.

Etwa die Hälfte der Weltbevölkerung ist mit *Helicobacter pylori* besiedelt. Durch geeignete Screening-Programme (Serologie, Atemtest und PCR) lassen sich Risikogruppen leicht identifizieren. In diesen Fällen käme dem prophylaktischen Einsatz von nisinoiden Substanzen eine nicht zu unterschätzende volkswirtschaftliche Bedeutung zu.

Der prophylaktische Einsatz von Nisin ist medizinisch unbedenklich, da es nicht resorbiert wird und durch Pankreasenzyme insbesondere Alpha-Chymotrypsin inaktiviert wird.

Die Applikation der Medikamente erfolgt solange, bis das Ziel der Behandlung, nämlich die Schmerzbefreiung und die Keimeradikation, erfolgt ist. Da viele der diskutierten Bakterien ubiquitär vorkommen, ist eine Reinfektion jedoch nicht auszuschließen.

Aus therapeutischer Sicht ergeben sich folgende Indikationen:

- Ulcus duodeni
- Ulcus duodeni mit gastrischer Metaplasie
- Ulcus ventriculi
- Magenläsionen mit intestinaler Metaplasie
- Erosionen
- chronisch aktive Gastritis
- chronisch inaktive Gastritis (z. B. atrophische)
- chronisch inaktive Gastritis mit Metaplasie und/ oder Dysplasie
- sonstige Gastritiden
- akute Gastritis
- Duodenitis
- nicht-ulzeröse Dyspepsie und funktionale Dyspepsie
- andere gastro-intestinale Krankheiten
- Barrett's Ösophagus mit Dysplasie oder Metaplasie
- Erkrankung auf der Basis heterotopischer Magenmukosa im Verdauungstrakt (z. B. im Meckelschen Divertikel)
- Ösophagopathien (z. B. Refluxösophagitis)
- Magenkrebs

Weitere Indikationen sind:

- Erkrankungen auf der Basis einer Besiedlung der verdauungstraktassoziierten Ausführungsgänge mit Bakterien (z. B. der Brunnerschen Drüsen)
- endokrine Störungen wie Hypergastrinämie und Hyperpepsinogenämie
- psychische Störungen (z. B. Depression)
- Ménétrier-Krankheit
- Gastropathien, z. B. protein-losing hypertrophic gastropathy oder gastrische Lymphome

Die Verwendung eines Lantibioticums, insbesondere eines nisinoiden Wirkstoffes, erweist sich als eine äußerst wirksame Maßnahme zur Abtötung von aggressiven Magenbakterien. Nisinoide Substanzen sind gegenüber Magensaft resistent, weil sie Lanthionin und/ oder Methyllanthionin enthalten und können sogar bei einem pH-Wert von 1 – 2, der typischerweise im Magen vorliegt, ihre optimale Wirkung entfalten.

Der Einsatz nisinoider Substanzen ist auch bei Haus- und Nutztieren sowie Labor- und Zootieren angezeigt. Bei diesen Tieren wurden Bakterien nachgewiesen, die in der gleichen ökologischen Nische wie *Helicobacter pylori* beim Menschen vorkommen. *Helicobacter pylori* ist unter normalen Bedingungen humanspezifisch und kommt mit Ausnahme des Affen bei den oben genannten Tieren nicht vor.

Mangels ausreichender Untersuchungsergebnisse und taxonomischer Turbulenzen auf diesem speziellen Sektor werden diese spiraligen Organismen derzeit wie in der Publikation "An Uncultured Gastric Spiral Organism Is a Newly Identified *Helicobacter* in Humans", Jay V. Solnick, Jani O'Rourke, Adrian Lee, Bruce J. Paster, Floyd E. Dewhirst and Lucy S. Tompkins, *The Journal of Infectious Diseases*, 1993, 168, Seite 379 ff, eingeteilt.

Folgende Bakterien werden aufgeführt:

- *Helicobacter canis*
- *Helicobacter felis* DS3
- *Helicobacter felis* CS1
- (*Gastrosprillum hominis*) 2
- (*Gastrosprillum hominis*) 1
- *Helicobacter pylori*
- *Helicobacter acinonyx*
- *Helicobacter* sp. CL03
- *Helicobacter mustelae*
- *Helicobacter fennelliae*
- *Helicobacter muridarum*
- *Helicobacter cinaedi*
- (*Flexispira rappini*)
- *Wolinella succinogenes*
- *Campylobacter fetus* ss *fetus*
- *Campylobacter largi*
- *Campylobacter coli*
- *Campylobacter jejuni*

Die von Tieren isolierten Bakterien des *Campylobacter-Helicobacter*-Komplexes induzieren dem Menschen vergleichbare gastro-intestinale Läsionen, so daß auch hier der Nisineinsatz wirtschaftlich sinnvoll erscheint. Außerdem werden sie häufig auf den Menschen übertragen und erzeugen dann das von *Helicobacter pylori* bekannte Bild. Auch dieses Keimspektrum sollte mit nisinoiden Substanzen angegangen werden.

Bei der Herstellung und Anwendung des Präparates kann die Wasserlöslichkeit von Nisin genutzt werden. Die Wasserlöslichkeit ist abhängig vom jeweils vorliegenden pH-Wert und beträgt für eine Wassermenge von 100 Milliliter 12 Gramm bei einem pH-Wert von 2,4, 1 Gramm bei einem pH-Wert von 5,6 und 0,075 Gramm bei einem pH-Wert von 7,0. Insbesondere bei niedrigen pH-Werten ist somit eine hohe Wasserlöslichkeit gegeben. In nichtpolaren Lösungsmitteln ist hingegen eine vergleichsweise ausgeprägte Unlöslichkeit gegeben.

Nisin gehört zur Gruppe der Polypeptidantibiotika, Untergruppe Lantibiotica, und besteht aus 34 Aminosäuren. Dieses Polypeptid wird von gewissen Stämmen von *Lactococcus lactis* ssp. produziert.

Unter Lantibiotica, deren bevorzugte Ausbildung in Subtilin, Nisin und nisinoiden Substanzen zu sehen ist, werden unter anderem auch Bakteriozine verstanden, die Lanthionin und/oder Methyllanthionin enthalten.

Charakteristisch ist, daß innerhalb des Nisinmoleküls fünf Ringstrukturen vorhanden sind, die jeweils eine unterschiedliche Anzahl von Aminosäuren aufweisen. Das Molekulargewicht beträgt etwa 3500. Es sind jedoch auch Molekularstrukturen, insbesondere Di- oder Multimere, bekannt geworden, die Molekulargewichte von bis zu 14 000 aufweisen. Dies ist beispielsweise bei B. Jarvis, Jeffcoat, Joan & Cheeseman, *Bioch. Biophys. Acta*, 1968, 168 (1), Seite 153 angegeben.

Eine Wirkstoffherstellung mit bewährten Mitteln kann dadurch erfolgen, daß die nisinoiden Substanz als Nisin ausgebildet ist.

Der grundsätzliche Aufbau von Nisin sowie Möglichkeiten zur Produktion von Nisin ergeben sich aus den Patentschriften GB 844 782 und DE 11 95 434. Weitere Produktionsverfahren sind beispielsweise in den Patentschriften DE 16 17 580 sowie DE 20 00 818 angegeben. Nisinoiden Substanzen (antimikrobiell wirksame Peptidanaloga) können biotechnologisch hergestellt oder synthetisch erzeugt werden.

Durch "genetic engineering" oder gezielte Mutagenese können der natürlichen Substanz überlegene Mutanten produziert werden. Insbesondere ist es hierdurch möglich, eine Änderung der chemischen Konfiguration, beispielsweise durch Einführung neuer Aminosäuren beziehungsweise Ersatz oder Deletion von Aminosäuren oder bestimmten chemischen Gruppen, durchzuführen.

Diese und andere Lantibiotika eignen sich besonders gut zur Krebsbekämpfung in der entsprechenden galenischen Formulierung. Das spezielle pharmakologische Verhalten der Lantibiotika ermöglicht selektive Eliminierung von Tumorzellen.

Eine Kombination der nisinoiden Substanz mit Präparaten, die zu einer Reduktion der Mukosabarriere führen, potenziert die Wirksamkeit (z. B. Lysozym, kationische Detergenzien, Chelatoren, etc.). Das Lysozym wirkt z. B. nicht nur synergistisch, sondern es bewirkt auch eine Verzögerung der Resistenzentwicklung und ist wie Nisin magensaftresistent. Insbesondere ist an eine Kombination mit Permeabilisierern gedacht.

Die hohe Rückfallquote beziehungsweise Exazerbation gastro-intestinaler Erkrankungen läßt sich aufgrund eigener Untersuchungen darauf zurückführen, daß z. B. *Helicobacter pylori* intrazellulär in Magenepithelzellen persistiert. Diese intrazellulären Keime konnten mit den bisherigen Therapieverfahren nicht erreicht werden. Mit Hilfe von Liposomen oder Proteoliposomen läßt sich Nisin problemlos in die befallenen Zellen einschleusen und führt so zu einer Abtötung der Bakterien. Damit ist die Rezidivgefahr beseitigt.

Zur Erleichterung der Einnahme des Präparates wird vorgeschlagen, daß die zu verabreichende Dosis als Füllung einer Kapsel ausgebildet ist.

Die Dosiermenge kann bei einer Anordnung innerhalb einer Kapsel beispielsweise derart realisiert sein, daß die Füllung als eine pulverförmige Substanz ausgebildet ist. Es ist aber auch möglich, daß die Füllung als Lösung der Substanzen ausgebildet ist oder daß eine Dispersion (Suspension oder Emulsion) vorliegt.

Gemäß einer anderen Zubereitung ist es möglich, daß die Dosiermenge im Bereich einer Tablette angeordnet ist. Eine verzögerte Freisetzung des Präparates aus einer speziellen galenischen Formulierung ist denkbar. Hierzu können beispielsweise Liposomen oder Hydrogele entsprechend der Veröffentlichung "Hydrogels: Swelling, Drug Loading, and Release", S.W. Kim et al., *Pharmaceutical Research*, 9, 1992, Seiten 283-290 verwendet werden ebenso bioadhäsive Materialien natürlichen und synthetischen Ursprungs. Weitere galenische Formulierungen in dieser Hinsicht sind in der Publikation "Formulations releasing the drug proximal to the pylorus in the dog", J. Heinämäki et al., *International Journal of Pharmaceutics*, 48 (1988), Seite 51-61, beschrieben.

Zur Ermöglichung einer Wirkstoffentfaltung im Bereich des Magens ist auch daran gedacht, daß die Dosiermenge in einer dosierbaren Flüssigkeit enthalten ist und oral zugeführt wird. Es kann beispielsweise eine Lösung oder Dispersion vorliegen. Die orale Applikation ist grundsätzlich bei Magen- und Dünndarmanwendungen zweckmäßig.

Die diversen Möglichkeiten der Zusammensetzung des Präparates können durch folgende Hilfsstoffe ergänzt werden, z. B. Konservierungsstoffe, Puffersubstanzen, Trägerstoffe, Geschmackskorrigenzen, Farbstoffe, Bindemittel, Adhäsiva, Gleitmittel, Adsorbenzien, Eindickmittel und Verdüner. Durch den jahrzehntelangen, unbedenklichen Einsatz in der Lebensmittelkonservierung erscheint es zweckmäßig, die Wirkstoffkomposition mit sauren Getränken zu verabreichen (z. B. Fruchtsäfte, Cola-Getränke), was die Compliance erhöhen würde.

Antimikrobiell wirksame Substanzkombinationen, beschrieben in den PCT-Anmeldungen WO 93/13793-A (Blackburn et al.) und WO 92/18143 (SKB), können auch zur Anwendung gebracht werden; auch hinsichtlich der

Galenik und Dosierung. Eine weitere faszinierende Möglichkeit zur Beseitigung der einleitend genannten Bakterien wäre die probiotische Therapie. Hierbei werden lebende, Bakteriozineproduzierende Bakterien, wie z. B. Lactobazillen, eingesetzt, die selber harmlos sind, aber durch bakterizide Mechanismen zu einer Exklusion der pathogenen/fakulta-

tiv-pathogenen Keime führen.

Die probiotisch einzusetzenden "lactic acid bacteria" (LAB), von der FDA eingestuft als "Generally Recognized As Safe" (GRAS), sind Bestandteile der physiologischen Schleimhautflora und führen normalerweise eine mutualistische Lebensweise mit dem menschlichen Wirt.

Eine einfache Verdrängung oder Überwucherung der pathogenen *Helicobacter* Bakterien durch massenhaft eingebrachte Milchsäurebakterien (Prinzip der Konkurrenz) ist im Magen aufgrund der physikalisch-chemischen Besonderheiten aber nicht möglich.

In der vorliegenden Erfindung werden deshalb mit geeigneten Methoden haltbar gemachte Lactococci separat verpackt, die bei Revitalisierung und entsprechendem Nährstoffangebot ein Lantibioticum, zum Beispiel Nisin, produzieren. Diese Fertigpackung kann auch eine Mischung von zwei oder mehreren verschiedenen Bakterienstämmen enthalten, die unterschiedliche Lantibiotica produzieren, so daß eine synergistische Wirkung hinsichtlich der Bakterizide gegen *Helicobacter* entsteht; dies ist zum Beispiel der Fall für Nisin A und Nisin Z, die vergleichbare biologische Aktivitäten haben, sich aber in ihrem physikochemischen Profil (Löslichkeit, Stabilität, Aggregationsverhalten und Diffusion) unterscheiden, was für die wechselhaften Bedingungen im Magen von großem Vorteil ist.

In einer zweiten Fertigpackung, die als Basis ein Molkereiprodukt enthält, wird eine für die Vermehrung der o.a. Bakterien optimale Nährlösung bereitgestellt.

Durch das Zusammenbringen der beiden Fraktionen und anschließender oraler Verabreichung, beginnen die Starterkulturen sich im Magen exponentiell zu vermehren, und während der sogenannten Plateauphase werden therapeutische Konzentrationen von Lantibiotica in situ erzeugt.

Nach Mehrfachanwendung kommt es zu einer selektiven Eradikation von *Helicobacter* sp. Die Therapie ist biologisch spezifisch, sanft und schonend für den Patienten, da keinerlei Nebenwirkungen auftreten.

Durch Anreicherung des Molkereiproduktes mit fetthaltigen Mikrospähren (wie zum Beispiel in Milch vorhanden) läßt sich die Magenpassagezeit der o.a. Zubereitung erheblich verlängern und die bakterizide Wirkung auf *Helicobacter* sp. somit optimieren.

Unter Molkereiprodukten werden beliebige Milchprodukte auf der Grundlage von Milch von Säugetieren verstanden. Ggf. sind auch gleichartige Ersatzstoffe verwendbar.

Dieser Ansatz kann selbstverständlich auch prophylaktisch ausgenutzt werden.

Eine elegante Methode wäre z. B. für den gastro-intestinalen Bereich die Anreicherung von Yogurt mit Nisinproduzierenden Laktokokken; bei entsprechender Zubereitung und mit additiven Hilfsstoffen können die Compliance-Probleme mancher Patienten und ihre aggressiven Bakterien beseitigt werden.

Auf diese oder ähnliche Weise werden die von der WHO 1988 und H. Cranz aufgeführten Kriterien eines OTC-Arzneimittels in idealer Weise erfüllt; beschrieben in dem Aufsatz: Cranz, H. Over-the-counter-drugs: the issues. Drug Safety 5 (Suppl. 1): S. 120—125, 1990.

Unter Erkrankungen des Verdauungstraktes werden Erkrankungen des Darms, des Magens, der Speiseröhre oder der Mundhöhle verstanden.

NISIN — Empfindlichkeitstestung

Eine experimentelle Prüfung der Nisinwirkung auf *Helicobacter pylori* erfolgte gemäß der nachfolgenden Aufstellung.

1. Teststämme

Helicobacter pylori I, Herkunft MHH, 10.8.92
Helicobacter pylori II, MHH, 17.8.92 Die Stämme wurden als Gefrierkonserven (10% Glycerinzusatz) oder an Transportmediumträgern (Transwab) bei -172°C aufbewahrt.

2. Nährboden

Columbia-Agarbase (Fa. Merck) mit Zusatz von 10% Pferdeblut (Als Kochblutplatte hergestellt).

3. Kulturbedingungen

Anzüchtung im Anaerobentopf nach Brewer unter Verwendung von BBL CampyPac Plus der Fa. Becton Dickinson (standardisierte H_2 —, CO_2 -Atmosphäre).

4. Herstellung der Prüflösung

Als Testsubstanz wurde reines Nisin der Fa. "Aplin & Barrett LTD" verwendet. Die Testung der Substanz erfolgte bei 2 unterschiedlichen Lösungsmittel-pH, pH 4,43 und pH 2,0.

Folgende Konzentrationen wurden im 1. Versuchsansatz geprüft:

250 Mikrogramm/ml
 1 000 Mikrogramm/ml
 10 000 Mikrogramm/ml.

Da sich aus dem ersten Versuch kein Anhalt für eine unterschiedliche Wirkung bei pH 2,0 und pH 4,42 ergab,

wurde die Wiederholungsprüfung mit der auf pH 2,0 eingestellten Verdünnungslösung und mit folgenden Konzentrationen durchgeführt:

- 500 Mikrogramm/ml
- 5 1 000 Mikrogramm/ml
- 2 500 Mikrogramm/ml
- 5 000 Mikrogramm/ml
- 10 000 Mikrogramm/ml

10 5. Empfindlichkeitstestung nach DIN 58940, Teil 6 Agarverdünnungsmethode

Ausnahme von dieser Testdurchführung: Prüfung nicht auf Mueller-Hinton-Nährboden (blut- und serumfrei), sondern auf 10% Pferde-Kochblut-Agar, da die Keime bisher nicht auf serumfreien Nährböden zu züchten waren.

- 15 Bei der Agarverdünnungsmethode wurden dem noch flüssigen Nährboden die zu prüfenden Konzentrationen als 10-fach konzentrierte Lösung zugesetzt und mit dem Nährboden im Verhältnis 1 : 10 sorgfältig gemischt. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Teststämme als massives Inokulum und, wie in der DIN gefordert, als Keimsuspension auf die Agarplatten unterschiedlicher Nisinkonzentration aufgeimpft. Das Ergebnis wurde nach 4-tägiger Bebrütung bei 37° abgelesen.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

6. Ergebnis der Prüfung

6.1 Ergebnis der ersten orientierenden Prüfung mit der Nisinreinsubstanz

Tabelle 1

| Wachstum nach 4d 37° C | | | | |
|------------------------|------------|------------------------|------------|-----|
| Helicobacter pylori I | | Helicobacter pylori II | | |
| Massiv- | Verdünnung | Massiv- | Verdünnung | |
| einsaat | | einsaat | | |
| <hr/> | | | | |
| <u>pH 4,42</u> | | | | |
| Kontrolle | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 250 µg/ml | +++ | +++ | - | - |
| 1.000 µg/ml | + | - | - | - |
| 10.000 µg/ml | - | - | - | - |
| <u>pH 2,0</u> | | | | |
| Kontrolle | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 250 µg/ml | ++-+++ | ++-+++ | - | - |
| 1.000 µg/ml | +--++ | +/- | - | - |
| 10.000 µg/ml | - | - | - | - |
| <hr/> | | | | |
| Kontrolle | +++ | +++ | +++ | +++ |
| pH neutral | | | | |
| <hr/> | | | | |

Hierbei bedeutet

+++ konfluierendes Wachstum,

+/-, +, ++ reduziertes Wachstum,

- kein Wachstum.

6.2 Wiederholungsprüfung

Tabelle 2

| | Wachstum nach 4d 37°C | | | |
|-------------------|-----------------------|------------|------------------------|------------|
| | Helicobacter pylori I | | Helicobacter pylori II | |
| | Massiv- | Verdünnung | Massiv- | Verdünnung |
| | einsaat | | einsaat | |
| <hr/> | | | | |
| <u>pH 2,0</u> | | | | |
| Kontrolle | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 500 µg/ml | ++++ | +++ | - | - |
| 1.000 µg/ml | + | +/- | - | - |
| 2.500 µg/ml | - | - | - | - |
| 5.000 µg/ml | - | - | - | - |
| 10.000 µg/ml | - | - | - | - |
| <hr/> | | | | |
| Kontrolle | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <u>pH neutral</u> | | | | |
| <hr/> | | | | |

7. Zusammenfassung

H.p.I: Die Substanzwirkung beginnt bei 1000 µg/ml, die Hemmung ist komplett bei 2500 µg/ml,
H.p.II: Die Empfindlichkeit dieses Stammes, bzw. seine minimale Hemmkonzentration liegt bei (250 µg/ml.
Bei einer vorab erfolgten Prüfung dieser Substanz (Präparat SIGMA, keine Reinsubstanz) deutete sich eine
Wirkung der Substanz bei allen 5 geprüften Stämmen bei 250 µg/ml an (eine komplette Hemmung wurde nicht
erreicht).

Insgesamt ist in Abhängigkeit von der konkret vorliegenden Spezies der Bakterien und der konkreten
Realisierung des Lantibioticums, insbesondere der nisinoide Substanz, in einer pharmazeutischen Komposition
bereits ab einer Wirkstoffkonzentration von 1 µg/ml eine Wirkung zu erzielen.

Die bereits beispielhaft erwähnten Permeabilisierer zur Reduktion der Mucosabarriere und als Wirkstoffver-
stärker lassen sich grundsätzlich in folgende Gruppen einteilen:

1. Lysin-Polymere und Protamine,
2. Polykationische Peptide, beispielsweise Laktoferrin, Lysozym, Kathepsin G,
3. Aminoglykoside, karboxylische Ionophore,
4. kationische, anionische und amphotere Detergenzien, beispielsweise Benzalkoniumchlorid oder SDS,
5. Polymyxine, PMBM und entsprechende Derivate,
6. Chelatoren, beispielsweise div. EDTA's, HMP, NTA, Citrat,
7. Surfactants, beispielsweise Tweens, Tritons, Glyzeride,
8. allgemeine Permeabilisierer, beispielsweise Tris, Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺,
9. Kohlenhydratfettsäureester, beispielsweise Saccharosemonofettsäureester,
10. Bioadhäsive Substanzen,
11. Liposomen zur intrazellulären Abtötung von internalisierten Bakterien,
12. Zyklooxygenasehemmer wie z. B. Salicylsäuren
13. Protektive Antioxidanzien wie z. B. Vitamin C,
14. Andere Stoffe, die die Hydrophobizität des Magenschleims reduzieren.

Grundsätzlich können statt eines isolierten Permeabilisierers beliebige Kombinationen von zwei oder mehreren Permeabilisierern aus den oben angegebenen Gruppen eingesetzt werden, wobei die jeweilige Kombination von den Einsatzrandbedingungen abhängig ist.

Weiterhin können Substanzen mit antibakterieller Wirkung eingesetzt werden, die nicht antibiotische Pharmaka sind. Dazu gehören β -adrenerge Rezeptorantagonisten, Diuretica, nichtsteroidale Antophlogistika psychotherapeutische Pharmaka, Antihistaminika, Barbiturate, Mukolytika und Sekretolytika.

Die Behandlung von schmerzenden, Säure bedingten Verdauungstrakt-Läsionen erfolgt in einem 2-Phasen-Konzept. In der ersten Phase werden dem Patienten die akut-symptomatischen Beschwerden gelindert oder beseitigt. Dies kann mit Hilfe der nachfolgend aufgeführten Kombinationsmedikamente erfolgen.

Zur Unterstützung einer Schutzschichtbildung im Schleimhautbereich ist es möglich, Prostaglandine mit einem oder mehreren Lantibiotica zu kombinieren. Beispielsweise ist es möglich, als Prostaglandin Misoprostol zu verwenden, das unter der Handelsbezeichnung "Zytotec" verfügbar ist. Eine Behandlung zur Beeinflussung des Säureniveaus und zur Keimabtötung erfolgt beispielsweise durch eine Kombination eines Lantibioticums mit "Plain Antacids". Derartige Substanzen sind insbesondere als Aluminium-Magnesium-Hydroxid, als Hydro-talcit oder als Magaldrat ausgebildet. Diese Substanzen sind unter Handelsbezeichnungen wie "Maalox, Alma-phil, Talcid, Riopan und Magalphil" verfügbar.

Andere "Anti-Ulcerants" die mit Lantibiotica kombiniert werden können, sind Bismuthverbindungen und Sucralfat, die wiederum unter Bezeichnungen wie "Telen, Ulcogant und Sucraphil" gehandelt werden.

Eine weitere Klasse von Säureblockern sind die H₂-Antagonisten, die mit Lantibiotica kombiniert werden können. Hier sind insbesondere die Substanzen Cimetidine, Ranitidine, Famotidine, Nizatidine und Roxatidine zu nennen. Diese Substanzen sind unter Bezeichnungen wie "Tagamed, Cimephil, Zantac, Pepdul, Nizax und Roxit" verfügbar.

Schließlich können auch "Proton pump-Inhibitors" als Wirkstoff zur Säureblockung verwendet werden. Derartige Wirkstoffe sind beispielsweise Omeprazole und Lansoprazole, wobei hier typische Handelsbezeichnung "Losec, Antra und Agopton" lauten.

Jede der oben angeführten Substanzen kann mit einem oder mehreren Lantibiotica kombiniert werden. Zusätzlich ist eine Kombination mit den weiter vorstehend aufgeführten Wirkstoffverstärkern und Trägersubstanzen möglich.

Eine Durchführung einer Behandlung kann derart erfolgen, daß der behandelnde Arzt zunächst die Dauer der ersten Phase der Behandlung (individuell sehr verschieden und abhängig vom jeweils vorliegenden Krankheitsbild) bestimmt.

In der zweiten therapeutischen Indikationsphase, die sich durchaus mit der ersten überlappen kann, wird ein Lantibioticum, eventuell mit synergistisch wirkendem Hilfsstoff, eingesetzt, um eine Keimeradikation zu erzielen.

Die jeweiligen Einzeldosen der Kombinationstherapie (H₂-Blocker zum Beispiel plus Lantibioticum) richten sich nach dem Schweregrad der Erkrankung und der klinischen Symptomatik. Bei Säure bedingten, schmerzhaften Läsionen stünde die Antacida-Therapie bezüglich der Dosis im Vordergrund, die im Verlauf der Besserung zugunsten der alleinigen Lantibiotica-Therapie abgelöst werden würde.

Auf diese Weise werden Rezidivquoten auf ein Minimum reduziert, wobei die Kosten der Therapie einen Bruchteil der heute aufgewendeten Mittel betragen.

Die Dauer der Therapie mit Lantibiotica erfolgt so lange, bis eine Keimeradikation (siehe spezielle Nachweismethoden in diversen Publikationen) erreicht ist.

Unter Lantibiotica sind insbesondere Substanzen zu verstehen wie sie in der PCT-Anmeldung (PCT/DE93/01006) beschrieben sind.

Die bevorzugte Ausbildung eines Lantibioticums wird in der Form von Nisin oder eines nisinoiden Derivates gesehen.

Wiederum ist hier auf die zitierte PCT-Anmeldung zurückzugreifen, in der eine Vielzahl von Spielarten eines Polypeptidantibiotikums zur Therapie und Prophylaxe von Verdauungstrakt-assoziierten Läsionen beschrieben sind.

Die Kombinationspräparate, die vorstehend beschrieben sind und deren ein Hauptbestandteil ein spezielles Lantibioticum ist (was kein Bacteriocin sein muß, aber sein kann) versprechen optimale medizinische und wirtschaftliche Vorteile für das gesamte Gesundheitswesen. An dieser Stelle muß noch einmal deutlich betont werden, daß Bacteriocine Produkte von Bakterien sind.

Es ist aber auch keinesfalls eine halbsynthetische oder vollsynthetische Produktion ausgeschlossen. Auch die Übertragung der genetischen Information zur Lantibiotica-Produktion auf z. B. Hefezellen ist möglich. Das heißt, die strenge Beschränkung auf den bakteriellen Herstellungsprozeß entfällt hier, wie entgegengesetzt beispielsweise in der PCT-Anmeldung WO 92/18143 und der PCT-Anmeldung WO 93/13793 exklusiv vorausgesetzt wurde.

Diese Präparatekombinationen zur Behandlung verdauungstraktassoziierter Läsionen sind absolut neu und der nebenwirkungsreichen Triple-Therapie in allen Bereichen überlegen.

Patentansprüche

1. Präparatkombination zur Therapie und Prophylaxe von Erkrankungen des Verdauungstraktes, die bei Anwesenheit von Bakterien auftreten, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff mindestens ein Anteil zur Säurehemmung und/oder Neutralisation mit mindestens einem Bakterium zur probiotischen Erzeugung eines Lantibioticums im Verdauungstrakt kombiniert ist.
2. Präparatkombination nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als ein Wirkstoff mindestens ein

"Plain Antacid" vorgesehen ist.

3. Präparatkombination nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Plain Antacid als ein Aluminium-Magnesium-Oxid ausgebildet ist.

4. Präparatkombination nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Plain Antacid als Hydrotalcit ausgebildet ist.

5. Präparatkombination nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Plain Antacid als Magaldrat ausgebildet ist.

6. Präparatkombination nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Wirkstoff als ein "Antiulcerant" ausgebildet ist.

7. Präparatkombination nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Antiulcerant als Bismuthverbindung ausgebildet ist.

8. Präparatkombination nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Antiulcerant als Sulcralfat ausgebildet ist.

9. Präparatkombination nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Wirkstoff als H₂-Antagonist ausgebildet ist.

10. Präparatkombination nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der H₂-Antagonist als Cimetidine ausgebildet ist.

11. Präparatkombination nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der H₂-Antagonist als Ranitidine ausgebildet ist.

12. Präparatkombination nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der H₂-Antagonist als Famotidine ausgebildet ist.

13. Präparatkombination nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der H₂-Antagonist als Nizatidine ausgebildet ist.

14. Präparatkombination nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der H₂-Antagonist als Roxatidine ausgebildet ist.

15. Präparatkombination nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Wirkstoff als ein Protonen Pumpen-Inhibitor ausgebildet ist.

16. Präparatkombination nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Protonen Pumpen-Inhibitor als Omeprazole ausgebildet ist.

17. Präparatkombination nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Protonen Pumpen-Inhibitor als Lansoprazole ausgebildet ist.

18. Präparatkombination nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Protonen Pumpen-Inhibitor als Pransoprazole ausgebildet ist.

19. Präparatkombination nach einem der Ansprüche 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß eine Kombination mit einem Permeabilisierer vorgesehen ist.

20. Präparatkombination nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß eine Kombination mit mindestens einem Wirkstoffverstärker vorgesehen ist.

21. Präparatkombination zur Therapie und Prophylaxe von Erkrankungen des Verdauungstraktes, die bei Anwesenheit von Bakterien der Gattung *Helicobacter* auftreten, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoffe mindestens ein Anteil eines Lantibiotica produzierenden Bakteriums und ein Anteil eines Nährsubstrates vorgesehen sind, daß der Anteil des Bakteriums und der Anteil des Nährsubstrates voneinander getrennt sind und daß das Bakterium und die Nährlösung vor einer Anwendung miteinander vermischbar sind.

22. Präparatkombination nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß eine Anwendung im Bereich des Magens vorgesehen ist.